

PATENT ABSTRACTS OF JAPAN

(11)Publication number : 2000-342255
(43)Date of publication of application : 12.12.2000

(51)Int.Cl. C12N 15/09

A01H 1/00

(21)Application number : 11-158024 (71)Applicant : JAPAN TOBACCO INC
(22)Date of filing : 04.06.1999 (72)Inventor : HIEI YOSHIHIRO
KASAOKA KEISUKE
ISHIDA YUJI

(54) IMPROVEMENT IN EFFICIENCY OF GENE TRANSFER TO PLANT CELL

(57)Abstract:

PROBLEM TO BE SOLVED: To improve the efficiency of gene transfer to a plant cell simply carried out through a bacterium of the genus *Agrobacterium* without damaging a tissue, to perform transformation and to better a breed by heat-treating a plant cell or a plant tissue.

SOLUTION: A plant cell or a plant tissue derived from a plant selected from the group consisting of rice plant, maize, lawn grass and tobacco is heat-treated at 33-60° C, preferably 35-55° C, more preferably 37-52° C for 5 seconds to 24 hours, especially preferably at 37-52° C for 5 minutes to 24 hours to improve the efficiency of gene transfer to a plant cell carried out through a bacterium of the genus *Agrobacterium*. Preferably the plant cell or plant tissue is derived from an angiosperm, a monocotyledon or a gramineous plant. Preferably after the plant cell or plant tissue is heat-treated or centrifuged, a gene transfer treatment is performed.

LEGAL STATUS

[Date of request for examination]

[Date of sending the examiner's decision of rejection]

[Kind of final disposal of application other than the examiner's decision of rejection or application converted registration]

[Date of final disposal for application]

[Patent number]

[Date of registration]

[Number of appeal against examiner's decision of rejection]

[Date of requesting appeal against examiner's decision of rejection]

[Date of extinction of right]

3 燃料を熱処理することを作り、アグロバクテリウム底細胞を介して行われる植物細胞への遺伝子導入の効率を向上させる方法を提供する。

〔0013〕土壤細菌アグロバクテリウム (*Agrobacter tumefaciens*) が多くの双子葉植物に根状菌胞菌 (Crown gall disease) を引き起すことは古くから知られており、1970年代には、T-DNAミドが病原性に与することと、さらにはT-DNAミドの一部であるT-DNAが組み込まれることが発見された。その後この物質がノムに組み込まれることが発見された。その後このT-DNAは植物の成長に必要なホルモン（サイトカイニンとオーキシン）の合成に関与する遺伝子が存在し、細胞増殖因子でありながら植物細胞に発現することができる。T-DNAの切り出しと植物の生長過程におけるT-DNAの発現は、T-DNAが切り出されるたまではミトド上のヴィーリンヌス領域（viral region）に存在する遺伝子群が必要であり、またT-DNAが切り出されるたまではミトドの表面に存在するポーダー配列が必要である。他のアグロバクテリウム属細菌である *Agrobacter rhizogenes* や *Agrobacter brasilis* ミドによる同様なシステムを有している。

よどむかじには、
る方法を学びることができる。
【0010】熱処理条件は、用いる植物の種類や熱処理
する細胞又は組織の等に応じて適宜選択されるが、通
常、3.3℃～8.0℃、好ましくは3.5℃～5.5℃、さら
に好ましくは3.7℃～5.2℃で最短の熱処理時間で行はれ
る。熱処理の時間は、熱処理温度、用いる植物の
種類及び熱処理する細胞又は組織の種類等に応じて適宜
選択されるが、通常5秒間～2.4時間程度である。
なお、熱処理温度は、熱処理時間に合わせても
適応する細胞又は組織の等に応じて適宜選択されることがある。例え
ば、熱処理細胞が6.0℃の場合は5秒間程度の熱処理
時間でも適応子導入率を有意に向上させることができ
る場合がある。一方、熱処理細胞が3.4℃程度の細胞
場合には、数十時間の熱処理により適応子導入率を有
意に向上させることができると、特に好ましい熱処理条件
は、3.7℃～5.2℃で1分間～2.4時間程度の場合が多く
いが、その他の細胞又は組織等に応じて適宜選択するこ
とが可能である。なお、植物細胞又は組織細胞を5.5℃以上の温
度で長時間暖めたりして熱処理すると、細胞細胞がダメー
ジを受け、形質転換効率が低下する場合があるので、熱
処理温度が5.5℃以上の場合には、熱処理時間をお近く
し、例えば3分以下、好ましくは1分間以下程度に設
定して植物細胞がダメージを受けないようにすることが
好ましい。

【0011】本発明の方法は、アグロバクテリウム菌液細
胞と接触させる植物細胞又は植物組織として熱処理細
胞を用いるが、熱処理を行なわながらアグロバクテリ
ウム菌液細胞と接触させることを特徴とするものであり、
アグロバクテリウム菌液細胞を用いた適応子導入あるいは
形質転換方法自体としては、既知の方法をそのまま適用
することができる。

【0012】アグロバクテリウム菌液細胞を用いた植物へ
の適応子導入あるいは形質転換方法自体は、この分野に
おいて既存技術（Hokkema et al., 1983 (参考文献10))、
本発明が存在しない、（植物バイオテクノロジ
ー、植物バイオテクノロジー）の存在する必要がある（図4）。

2. **[0016] アクロバクテリウムとB1 (Watson et al., 1975 (参考文献(4)))** は、強制性 (*super-virulent*) の菌系であり、その宿主細胞は広く、形質転換能障害を他の菌系よりも高い(Hood et al., 1987 (参考文献(5)))。Komari, 1989 (参考文献(23)))。この特徴は、A28がA4するアラバミミドの約18.64%によるものである(Hood et al., 1984 (参考文献(18))) ; Jin et al., 1987 (参考文献(22))) ; Komari et al., 1986 (参考文献(26)))。Kondo et al., 2001 (参考文献(7)) で、これまでにこの新しいシステムが開発されている。一つはpB1052のディスクアーム型のアラバミミドを有する菌系質粒(Hood et al., 1986 (参考文献(19)))およびpB1050(Hood et al., 1991 (参考文献(16)))を用いたものであり、これらを上述のバイナリーベクターシステムに適用することにより、形質転換能の高いシステムとして種々の植物の形質転換に利用されている。もう一つは、スーパー二ナリーベクター ('super-binary vector') (Hirai et al., 1994 (参考文献(13))) ; Ishii et al., 1996 (参考文献(20)) ; Komari et al., 1999 (参考文献(28)))。W094/00977号、W095/0672号システムである(図4)。このシステムは、vif質粒 (vifA, vifB, vifC, vifD, vifE) と以下、これらをそれぞれ 'vif断片複数' といふことである。)を持つディスクアーム型のDTBラミドおよびDTB-DNAを有するプラスミドからなることから、ハイナリベクターシステムの一端である。しかしながら、T-DNAを有する側のプラスミド、即ちハイナリベクターにはT-DNA片断のうち、少なくとも片端部を含む側断片 (このうち最も多くは少くとも1/10又は1/100を含む断片、さらに好ましくは少くとも1/100又は1/1000を含む断片) を組み込んだ(Komari, 1990a (参考文献(24)))。スーパー二ナリーベクターを用いる点で異なる。なお、スーパー二ナリーベクターを用いるアクロバクテリウムに、所望の遺伝子を組み込んだT-DNA質粒を導入するには、三系文庫法を介した相組接

設置されるものである。しかし、プラスミドが細胞であるため、環境条件の変化はいつももよく、複数の遺伝子を異なる部位に配置しようとする場合には、境界配列が3個以上あってもよい。また、アプロバクテリウム原核細胞中で、下記ではR1プラスミド上に配置されてもよい。さらには、複数の遺伝子の複数のプラスミド上に配置されてもよい。

【0023】アプロバクテリウム原核細胞をアプロバクテリウム原核細胞と単に接觸させることにより取り得る導入を行なう方法が、植物細胞又は動物細胞によく用いられる方法であるが、アプロバクテリウム原核細胞は、通常は、10⁶～10⁷個/mlの細胞濃度で存在する。

1) 期間延長改
とにより行う
は報道は、何
事、その他の
うな報道がし
よい。ま
す。植物が好ま
葉植物でもよ
示されるよう
バクテリウム
向上する。ま
るが進化で導入が
するだけでは
は進化で導入が
本発明の方法
從って、本発
は、既来の方

(0.03.6.1.5) 結果

各種処理温度で未熟胚を10分間処理し、LBA4040 (pTO23 40)との共存培養を行い、GUS遺伝子の一過性発現を観察した結果を表1および図2に示した。無熟胚区に比べ、GUS発現率は明らかに広く、より適度で選択子導入が生じたものと認められた。一方、5°C以上の熱処理では植物組織にダメージを与えることがあり、GUS処理では未熟胚の生長を抑制し、GUS発現も阻害された。10°C処理の短時間処理では、43°C試験区における明瞭なGUS発現が認められなかった。

【0.03.7】 イネ未熟胚とアグロバクテリウムを共存培養した後、選択子導入して得られた形質転換カルブの選択結果を表3および図4に示した。LBA4040 (pTO23 40)との共存培養 (13) は、GUS発現率がイネの未熟胚で最も高い結果であった。

【0.03.7.1】 イネ未熟胚とアグロバクテリウムを共存培養した後、選択子導入して得られた形質転換カルブの選択結果を表3および図4に示した。LBA4040 (pTO23 40)との共存培養 (13) は、GUS発現率がイネの未熟胚で最も高い結果であった。

ハーバイナリーベクターのIR4404(gf02623)を用いた試験においてのみ、形質転換体を得ている。本研究における他のバイナリーベクターを用いた場合においても、スーパーハーバイナリーベクターを用いることによって、より一層効率的に形質転換体を得ることが可能である。

処理時間	供試品 組成	未燃出数					
		未燃出組成における QS 発現割合 (%)					
		0	1-10	10-20	20-50	50-100	100
無理 (全組)	20	1	6	12	1	0	0
45°C	20	1	5	12	2	0	0
46°C	20	0	0	3	3	7	6
							1

※ [表2] 表2 处理温度と未燃出組成におけるQS発現子
20 °C一過性出現 (品種: 初の光)

供試菌系: LBA4404(ptC233), 热处理時間: 10分, 共存培養期間: 4日
培養期間: 4日
00421

处理方法	供试末熟度	成熟度					
		质连通率 (%)					
物理方法	0	0-10	10-20	20-50	50-80	80-100	
物理方法	20	1	6	12	1	0	0
物理方法	20	1	5	12	2	0	0
物理方法	20	0	0	3	3	7	6
物理方法	20	0	0	3	3	7	6

供試樹種: LBA4404(ptC233), 熱処理時間: 10分, 共存
培養期間: 4日
※ [表2] 表2 処理温度と未熟胚胚盤におけるQUS遺伝子
20 の遺伝表現 (品種: 初の光)

規則性度	規則性度 数値	規則性度における GUS 累積出現割合 (%)					
		0-10	10-20	20-30	30-40	40-50	50-60
規則性度 (GUS)	20	0	2	13	3	2	0
30C	20	0	1	9	2	7	1
40C	20	0	0	1	3	8	6
50C	20	0	1	6	5	6	0
60C	20	3	4	4	2	6	1
70C	20	0	0	0	0	0	0

★ (表3) 表3 未熱処理と形質転換カルスの追拔効率 (品種: 明の光)
〔0043〕

処理	他の水素種 割合(%)	NaOH 0.5% 搾出 カリムス酸(%)	BA (%)
熱処理 (450 °C)	50	6	12.0
熱処理 (450 °C 5 分)	51	15	28.4

【表4】表4 未熟胚への熱処理と形質転換カルスの選択標準（品種：朝の光）

(8)			
処理	供試初期 切片数 (N)	Pm 耐性G3 残生 カクテ数 (E)	B/A (%)
無処理 (S0)	50	1	2.0
4°C 5分	50	6	12.0

供試菌系 : LBA4404(pGLO217m), 共存培養期間 : 5日, P : バクテリオフローカル (品種: 鮎の光)
m : バロセマイシン
[0 0 4 5]

處理	促進根部吸收 的切片數 (A)	抑制根部吸收 的切片數 (B)	B/A (%)
無處理 (C)	50	1	2.0
5% 5-ASA	50	6	12.0

供試菌系：LA4404(pGIZ21m)、共存酵母屬：S1, P
m: ハロモイシン
[0045] *10
* [表5] 表5 未熟胚への熱処理と形成転換カルスの過
接効率（品種：朝の光）

處理	操作部位 切片數(4)	PPI 預生GL 脊生 力(±大數)	B/A (%)
無處理 (对照)	62	18	28.0
6°C 5分	64	32	50.0

〔0.046〕 供試菌系：LB4104(OHRI31), 共存培養期間：6日 ※ [表6] 表6 カルスへの熱処理と形質転換カルスの選択効率 (品種：朝の光)

處理	效(A)	力之數(B)
鏡處理	133	32
46°C 3分	111	41
46°C 10分	105	38

供試種群 : LBA404(070233), 并存期間 : 3日
【0047】実験例2
大きさ約1.2 mmのトモロコシネズミ (Gerbis alb.)、風林
水産省生物資源研究所より入手) を無菌的に取り出し、
1%ペニシリンGと0.2%アミカacinを含む2 mlのチューブに入れた。同様
培地で一夜乾燥した後、46°Cのオーバーバスにてチューブを1-10回振盪
し、10倍希釈して1 mlを用いた。1 mlを用いた。1 mlを用いた。

处理	切片数 (N)	大小(微米)	时间
熏蒸灭菌 (65°C, 5 分)	50	6	12.0
熏蒸灭菌 (65°C, 5 分)	51	15	12.4

試験番号	結果	US登録特許	US登録特許
RT	-	+	結果未記載
47°C	10分	+	結果未記載
40°C	20分	++	結果未記載
	10分	+++	結果未記載

*+:弱+, ++:やや強+, +++:強+

試験番号 : 184404(010233),共存培養時間 : 2日

〔発明の効果〕 本発明により、従来のアグロバクテリウムによる遺伝子導入方法よりも高い効率で、組織を付せずともよく面倒に遺伝子導入を行なうことができる。

〔発明の方法〕 本発明の方法は、両子葉植物に対しても双子葉植物に対しても適用可能である。また、シノのように、従来のアグロバクテリウム法では形質転換することができなかった植物も、本発明の方法により形質転換が可能になつた。

〔0065〕参考文献

(1) Aida, N., RR, Hodges TK (1996) Agrobacterium transformation-mediated transformation of japonica and indica rice varieties. *Planta* 199: 612-617(2) An, G., Evert, P.R., Nitra, A. and Ha, S.B. (1998) Binary vectors. In Gelvin, S.B. and Schilperoort, R.A. (eds.), *Plant Molecular Biology Manual A* 3. Kluwer Academic Press, Dordrecht, pp. 1-19.(3) Asano, Y., Iwaki, M. (1994) Transgenic plants of *Abrus* alba obtained by electroporation-mediated direct gene transfer into protoplasts. *Plant Cell Reports* 13:243-246.(4) Asano, Y., Ito, Y., Fukami, M., Sugiura, K., Furutiae, A. (1996) Herbicide-resistant transgenic *Arundo* plants obtained by electroporation-mediated direct gene transfer into protoplasts. *Plant Cell Reports* 15:179-180.(5) Bevan, M. (1984) Binary Agrobacterium vectors for plant transformation. *Nucleic Acids Res.* 12, 8711-8721.(6) Bidney, D., Scelcone, C., Murrich, J., Burris, H., Sims, L., and Hoffmann G. (1992) Microprojectile bombardment of plant tissues increases transformation frequency by Agrobacterium tumefaciens. *Plant Mol. Biol.* 18, 303-313(7) Chan, M.-I., Cheng, H.-H., Ho, S.-L., Tong, W.F. and Yu, S.-H. (1993) Agrobacterium-mediated production of transgenic rice plants expressing a chimeric α -amylase promoter/ β -glucuronidase gene.

etiology, 2, 702-709.

(19) Horsch, R. B., Fry, J. E., Hoffmann, N. L., Eichholz, D., Rogers, S. G. and Fraley, R. T. (1985) A simple and general method for transferring genes into plants. *Science* 231, 1229-1231.(20) Ishida, Y., Saito, H., Oita, S., Hiei, Y., Komari, T., and Kumashiro, T. (1996) High efficiency transformation of maize (*Zea mays* L.) mediated by Agrobacterium tumefaciens. *Nature Biotechnol.* 14, 745-750.(21) Fraley, R.T., Rogers, S.G., Horsch, R.B., Eichholz, D.A. and Fllick, J.S. (1985) The SEV system: a new disarmed Ti plasmid vector for plant transformation. *Bio/technology*, 3, 629-635.(22) Fraley, R.T., Rogers, S.G., Horsch, R.B., Sanders, P.R., Fllick, J.S., Adams, S.P., Blittner, M.L., Brand, L.A., Fink, C.L., Fry, J.S., Galluppi, G.R., Goldberg, S.B., Hoffmann, N.L. and Hoo, S.C. (1983) Expression of bacterial genes in plant cells. *Proc Natl Acad Sci USA*, 80, 4803-4807.(23) Hartman, C.L., Lee, L., Day, P.R., Turner, N.E. (1994) Herbicide resistant turfgrass (*Agrostis palustris* Huds.) by biotic transformation. *Biotechnology* 12:919-923.(24) Hiei, Y., Oita, S., Komari, T. and Kumashiro, T. (1994) Efficient transformation of rice (*Oryza sativa* L.) mediated by Agrobacterium and sequence analysis of the boundaries of the T-DNA. *The Plant Journal*, 6, 271-282.(25) Hoekema, A., Hirsch, P.R., Hooykaas, P.J.J. and Schilperoort, R.A. (1983) A binary plant vector strategy based on separation of vir- and T-region of the Agrobacterium tumefaciens Ti-plasmid. *Nature* 303, 179-180.(26) Hood, E.E., Horsch, R.T. and Chilton, M.-D. (1987) Virulence of Agrobacterium tumefaciens strains A281 and Ti8542. *J. Bacteriol.*, 166, 88-94.(27) Komari, T., Hiei, Y., Saito, Y., Murai, N. and Kumashiro, T. (1996) Vectors carrying two separate T-DNA for co-transformation of higher plants mediated by Agrobacterium tumefaciens and segregation of transformants free from selection markers. *Plant J.* 10, 165-174.(28) Komari, T. and Kubo, T. (1999) Methods of Genetic Transformation: Agrobacterium tumefaciens. In Vasili, I.K. (ed.) *Molecular Improvement of cereal crops*. Kluwer Academic Publishers, Dordrecht, pp. 49-82.(29) Li, H.-Q., Sautter, C., Potrykus, I., and Piontti-Kaerlas, J. (1996) Genetic transformation of cassava (*Mannihot esculenta* Crantz). *Nature Biotechnology*, 14, 736-740.(30) Lindsey, K., Gallois, P. and Eady, C. (1991) Regeneration and transformation of sugarbeet by Agrobacterium tumefaciens. *Plant Tissue Culture Manual* 5:1-9. Kluwer Academic Publishers.

(31) Zabotra, P., Jocs, H., Garettello, C., Leenaers, J., Van Montagu, M. and Schell, J. (1983) A pLasmid vector for the introduction of DNA into plant cells without alteration of their normal genome

(32) Marashige, T. and Skoog, F. (1962) *Physiol. Plant* 15:474-497.(33) Oita, S., Mita, S., Hattori, T., Nakamura, K. (1996) Construction and expression in tobacco of β -D-glucuronidase (GUS) reporter gene containing an intron within the coding sequence. *Plant Cell Physiol.* 31:805-813.(34) Potrykus I., Iarms, C. T. and Loritz, H. (1979) Callus formation from plant protoplasts of corn (*Zea mays* L.). *Theor. Appl. Genet.* 54:209-214.(35) Potrykus, I., Biliang, R., Futterer, J., Sautter, C. and Schrott, M. (1998) *Agricultural Biotechnology*, Marcel Dekker Inc. pp. 119-159.(36) Rogers, S.C., Horsch, R.B. and Fraley, R. T. (1988) Gene transfer in plants: Production of transformed plants using Ti plasmid vectors. *Method for Plant Molecular Biology*, CA: Academic Press Inc. pp. 423-436.(37) Saito, Y., Komari, T., Matsuura, C., Hayashi, Y., Kumashiro, T. and Takamori, Y. (1992) Cucumber mosaic virus-colerizer transgenic tomato plants expressing a satellite RNA. *Theor. Appl. Genet.* 83, 679-683.(38) Toriyama, K. and Hinata, K. (1985) *Plant Science* 41:179-183.(39) Trick, H.N. and Finer, J.J. (1997) *SAT1*: sonication-assisted Agrobacterium-mediated transformation. *Transgenic Research* 6:329-336.

(40) Viesser, R.G.F. (1991) Regeneration and transfor-

mation of potato *Agrobacterium tumefaciens*. *Plant Tissue Culture Manual* B5:1-9. Kluwer Academic Publishers.(41) Watson, B., Currier, T.C., Gordon, M.P., Chilton, M.-D. and Nester, E.W. (1975) Plasmid required for virulence of *Agrobacterium tumefaciens*. *J. Bacteriol.* 123, 235-264.(42) Xiao, L., Ha, S.-B. (1997) Efficient selection and regeneration of cropping bontgrass transformants following particle bombardment. *Plant Cell Reports* 16:874-878.

(43) Zabotra, P., Jocs, H., Garettello, C., Leenaers, J., Van Montagu, M. and Schell, J. (1983) A pLasmid vector for the introduction of DNA into plant cells without alteration of their normal genome

(44) Zabotra, P., Jocs, H., Garettello, C., Leenaers, J., Van Montagu, M. and Schell, J. (1983) A pLasmid vector for the introduction of DNA into plant cells without alteration of their normal genome

(45) Zabotra, P., Jocs, H., Garettello, C., Leenaers, J., Van Montagu, M. and Schell, J. (1983) A pLasmid vector for the introduction of DNA into plant cells without alteration of their normal genome

(46) Zabotra, P., Jocs, H., Garettello, C., Leenaers, J., Van Montagu, M. and Schell, J. (1983) A pLasmid vector for the introduction of DNA into plant cells without alteration of their normal genome

(47) Zabotra, P., Jocs, H., Garettello, C., Leenaers, J., Van Montagu, M. and Schell, J. (1983) A pLasmid vector for the introduction of DNA into plant cells without alteration of their normal genome

(48) Zabotra, P., Jocs, H., Garettello, C., Leenaers, J., Van Montagu, M. and Schell, J. (1983) A pLasmid vector for the introduction of DNA into plant cells without alteration of their normal genome

(49) Zabotra, P., Jocs, H., Garettello, C., Leenaers, J., Van Montagu, M. and Schell, J. (1983) A pLasmid vector for the introduction of DNA into plant cells without alteration of their normal genome

(50) Zabotra, P., Jocs, H., Garettello, C., Leenaers, J., Van Montagu, M. and Schell, J. (1983) A pLasmid vector for the introduction of DNA into plant cells without alteration of their normal genome

(51) Zabotra, P., Jocs, H., Garettello, C., Leenaers, J., Van Montagu, M. and Schell, J. (1983) A pLasmid vector for the introduction of DNA into plant cells without alteration of their normal genome

(52) Zabotra, P., Jocs, H., Garettello, C., Leenaers, J., Van Montagu, M. and Schell, J. (1983) A pLasmid vector for the introduction of DNA into plant cells without alteration of their normal genome

(53) Zabotra, P., Jocs, H., Garettello, C., Leenaers, J., Van Montagu, M. and Schell, J. (1983) A pLasmid vector for the introduction of DNA into plant cells without alteration of their normal genome

(54) Zabotra, P., Jocs, H., Garettello, C., Leenaers, J., Van Montagu, M. and Schell, J. (1983) A pLasmid vector for the introduction of DNA into plant cells without alteration of their normal genome

(55) Zabotra, P., Jocs, H., Garettello, C., Leenaers, J., Van Montagu, M. and Schell, J. (1983) A pLasmid vector for the introduction of DNA into plant cells without alteration of their normal genome

(56) Zabotra, P., Jocs, H., Garettello, C., Leenaers, J., Van Montagu, M. and Schell, J. (1983) A pLasmid vector for the introduction of DNA into plant cells without alteration of their normal genome

(57) Zabotra, P., Jocs, H., Garettello, C., Leenaers, J., Van Montagu, M. and Schell, J. (1983) A pLasmid vector for the introduction of DNA into plant cells without alteration of their normal genome

(58) Zabotra, P., Jocs, H., Garettello, C., Leenaers, J., Van Montagu, M. and Schell, J. (1983) A pLasmid vector for the introduction of DNA into plant cells without alteration of their normal genome

(59) Zabotra, P., Jocs, H., Garettello, C., Leenaers, J., Van Montagu, M. and Schell, J. (1983) A pLasmid vector for the introduction of DNA into plant cells without alteration of their normal genome

(60) Zabotra, P., Jocs, H., Garettello, C., Leenaers, J., Van Montagu, M. and Schell, J. (1983) A pLasmid vector for the introduction of DNA into plant cells without alteration of their normal genome

(61) Zabotra, P., Jocs, H., Garettello, C., Leenaers, J., Van Montagu, M. and Schell, J. (1983) A pLasmid vector for the introduction of DNA into plant cells without alteration of their normal genome

(62) Zabotra, P., Jocs, H., Garettello, C., Leenaers, J., Van Montagu, M. and Schell, J. (1983) A pLasmid vector for the introduction of DNA into plant cells without alteration of their normal genome

(63) Zabotra, P., Jocs, H., Garettello, C., Leenaers, J., Van Montagu, M. and Schell, J. (1983) A pLasmid vector for the introduction of DNA into plant cells without alteration of their normal genome

(64) Zabotra, P., Jocs, H., Garettello, C., Leenaers, J., Van Montagu, M. and Schell, J. (1983) A pLasmid vector for the introduction of DNA into plant cells without alteration of their normal genome

(65) Zabotra, P., Jocs, H., Garettello, C., Leenaers, J., Van Montagu, M. and Schell, J. (1983) A pLasmid vector for the introduction of DNA into plant cells without alteration of their normal genome

(66) Zabotra, P., Jocs, H., Garettello, C., Leenaers, J., Van Montagu, M. and Schell, J. (1983) A pLasmid vector for the introduction of DNA into plant cells without alteration of their normal genome

(67) Zabotra, P., Jocs, H., Garettello, C., Leenaers, J., Van Montagu, M. and Schell, J. (1983) A pLasmid vector for the introduction of DNA into plant cells without alteration of their normal genome

(68) Zabotra, P., Jocs, H., Garettello, C., Leenaers, J., Van Montagu, M. and Schell, J. (1983) A pLasmid vector for the introduction of DNA into plant cells without alteration of their normal genome

(69) Zabotra, P., Jocs, H., Garettello, C., Leenaers, J., Van Montagu, M. and Schell, J. (1983) A pLasmid vector for the introduction of DNA into plant cells without alteration of their normal genome

(70) Zabotra, P., Jocs, H., Garettello, C., Leenaers, J., Van Montagu, M. and Schell, J. (1983) A pLasmid vector for the introduction of DNA into plant cells without alteration of their normal genome

(71) Zabotra, P., Jocs, H., Garettello, C., Leenaers, J., Van Montagu, M. and Schell, J. (1983) A pLasmid vector for the introduction of DNA into plant cells without alteration of their normal genome

(72) Zabotra, P., Jocs, H., Garettello, C., Leenaers, J., Van Montagu, M. and Schell, J. (1983) A pLasmid vector for the introduction of DNA into plant cells without alteration of their normal genome

(73) Zabotra, P., Jocs, H., Garettello, C., Leenaers, J., Van Montagu, M. and Schell, J. (1983) A pLasmid vector for the introduction of DNA into plant cells without alteration of their normal genome

(74) Zabotra, P., Jocs, H., Garettello, C., Leenaers, J., Van Montagu, M. and Schell, J. (1983) A pLasmid vector for the introduction of DNA into plant cells without alteration of their normal genome

(75) Zabotra, P., Jocs, H., Garettello, C., Leenaers, J., Van Montagu, M. and Schell, J. (1983) A pLasmid vector for the introduction of DNA into plant cells without alteration of their normal genome

(76) Zabotra, P., Jocs, H., Garettello, C., Leenaers, J., Van Montagu, M. and Schell, J. (1983) A pLasmid vector for the introduction of DNA into plant cells without alteration of their normal genome

(77) Zabotra, P., Jocs, H., Garettello, C., Leenaers, J., Van Montagu, M. and Schell, J. (1983) A pLasmid vector for the introduction of DNA into plant cells without alteration of their normal genome

(78) Zabotra, P., Jocs, H., Garettello, C., Leenaers, J., Van Montagu, M. and Schell, J. (1983) A pLasmid vector for the introduction of DNA into plant cells without alteration of their normal genome

(79) Zabotra, P., Jocs, H., Garettello, C., Leenaers, J., Van Montagu, M. and Schell, J. (1983) A pLasmid vector for the introduction of DNA into plant cells without alteration of their normal genome

(80) Zabotra, P., Jocs, H., Garettello, C., Leenaers, J., Van Montagu, M. and Schell, J. (1983) A pLasmid vector for the introduction of DNA into plant cells without alteration of their normal genome

(81) Zabotra, P., Jocs, H., Garettello, C., Leenaers, J., Van Montagu, M. and Schell, J. (1983) A pLasmid vector for the introduction of DNA into plant cells without alteration of their normal genome

(82) Zabotra, P., Jocs, H., Garettello, C., Leenaers, J., Van Montagu, M. and Schell, J. (1983) A pLasmid vector for the introduction of DNA into plant cells without alteration of their normal genome

(83) Zabotra, P., Jocs, H., Garettello, C., Leenaers, J., Van Montagu, M. and Schell, J. (1983) A pLasmid vector for the introduction of DNA into plant cells without alteration of their normal genome

(84) Zabotra, P., Jocs, H., Garettello, C., Leenaers, J., Van Montagu, M. and Schell, J. (1983) A pLasmid vector for the introduction of DNA into plant cells without alteration of their normal genome

(85) Zabotra, P., Jocs, H., Garettello, C., Leenaers, J., Van Montagu, M. and Schell, J. (1983) A pLasmid vector for the introduction of DNA into plant cells without alteration of their normal genome

(86) Zabotra, P., Jocs, H., Garettello, C., Leenaers, J., Van Montagu, M. and Schell, J. (1983) A pLasmid vector for the introduction of DNA into plant cells without alteration of their normal genome

(87) Zabotra, P., Jocs, H., Garettello, C., Leenaers, J., Van Montagu, M. and Schell, J. (1983) A pLasmid vector for the introduction of DNA into plant cells without alteration of their normal genome

(88) Zabotra, P., Jocs, H., Garettello, C., Leenaers, J., Van Montagu, M. and Schell, J. (1983) A pLasmid vector for the introduction of DNA into plant cells without alteration of their normal genome

(89) Zabotra, P., Jocs, H., Garettello, C., Leenaers, J., Van Montagu, M. and Schell, J. (1983) A pLasmid vector for the introduction of DNA into plant cells without alteration of their normal genome

(90) Zabotra, P., Jocs, H., Garettello, C., Leenaers, J., Van Montagu, M. and Schell, J. (1983) A pLasmid vector for the introduction of DNA into plant cells without alteration of their normal genome

(91) Zabotra, P., Jocs, H., Garettello, C., Leenaers, J., Van Montagu, M. and Schell, J. (1983) A pLasmid vector for the introduction of DNA into plant cells without alteration of their normal genome

(92) Zabotra, P., Jocs, H., Garettello, C., Leenaers, J., Van Montagu, M. and Schell, J. (1983) A pLasmid vector for the introduction of DNA into plant cells without alteration of their normal genome

(93) Zabotra, P., Jocs, H., Garettello, C., Leenaers, J., Van Montagu, M. and Schell, J. (1983) A pLasmid vector for the introduction of DNA into plant cells without alteration of their normal genome

(94) Zabotra, P., Jocs, H., Garettello, C., Leenaers, J., Van Montagu, M. and Schell, J. (1983) A pLasmid vector for the introduction of DNA into plant cells without alteration of their normal genome

(95) Zabotra, P., Jocs, H., Garettello, C., Leenaers, J., Van Montagu, M. and Schell, J. (1983) A pLasmid vector for the introduction of DNA into plant cells without alteration of their normal genome

(96) Zabotra, P., Jocs, H., Garettello, C., Leenaers, J., Van Montagu, M. and Schell, J. (1983) A pLasmid vector for the introduction of DNA into plant cells without alteration of their normal genome

(97) Zabotra, P., Jocs, H., Garettello, C., Leenaers, J., Van Montagu, M. and Schell, J. (1983) A pLasmid vector for the introduction of DNA into plant cells without alteration of their normal genome

(98) Zabotra, P., Jocs, H., Garettello, C., Leenaers, J., Van Montagu, M. and Schell, J. (1983) A pLasmid vector for the introduction of DNA into plant cells without alteration of their normal genome

(99) Zabotra, P., Jocs, H., Garettello, C., Leenaers, J., Van Montagu, M. and Schell, J. (1983) A pLasmid vector for the introduction of DNA into plant cells without alteration of their normal genome

(100) Zabotra, P., Jocs, H., Garettello, C., Leenaers, J., Van Montagu, M. and Schell, J. (1983) A pLasmid vector for the introduction of DNA into plant cells without alteration of their normal genome

(101) Zabotra, P., Jocs, H., Garettello, C., Leenaers, J., Van Montagu, M. and Schell, J. (1983) A pLasmid vector for the introduction of DNA into plant cells without alteration of their normal genome

(102) Zabotra, P., Jocs, H., Garettello, C., Leenaers, J., Van Montagu, M. and Schell, J. (1983) A pLasmid vector for the introduction of DNA into plant cells without alteration of their normal genome

(103) Zabotra, P., Jocs, H., Garettello, C., Leenaers, J., Van Montagu, M. and Schell, J. (1983) A pLasmid vector for the introduction of DNA into plant cells without alteration of their normal genome

(104) Zabotra, P., Jocs, H., Garettello, C., Leenaers, J., Van Montagu, M. and Schell, J. (1983) A pLasmid vector for the introduction of DNA into plant cells without alteration of their normal genome

(105) Zabotra, P., Jocs, H., Garettello, C., Leenaers, J., Van Montagu, M. and Schell, J. (1983) A pLasmid vector for the introduction of DNA into plant cells without alteration of their normal genome

(106) Zabotra, P., Jocs, H., Garettello, C., Leenaers, J., Van Montagu, M. and Schell, J. (1983) A pLasmid vector for the introduction of DNA into plant cells without alteration of their normal genome

(107) Zabotra, P., Jocs, H., Garettello, C., Leenaers, J., Van Montagu, M. and Schell, J. (1983) A pLasmid vector for the introduction of DNA into plant cells without alteration of their normal genome

(108) Zabotra, P., Jocs, H., Garettello, C., Leenaers, J., Van Montagu, M. and Schell, J. (1983) A pLasmid vector for the introduction of DNA into plant cells without alteration of their normal genome

(109) Zabotra, P., Jocs, H., Garettello, C., Leenaers, J., Van Montagu, M. and Schell, J. (1983) A pLasmid vector for the introduction of DNA into plant cells without alteration of their normal genome

(110) Zabotra, P., Jocs, H., Garettello, C., Leenaers, J., Van Montagu, M. and Schell, J. (1983) A pLasmid vector for the introduction of DNA into plant cells without alteration of their normal genome

(111) Zabotra, P., Jocs, H., Garettello, C., Leenaers, J., Van Montagu, M. and Schell, J. (1983) A pLasmid vector for the introduction of DNA into plant cells without alteration of their normal genome

(112) Zabotra, P., Jocs, H., Garettello, C., Leenaers, J., Van Montagu, M. and Schell, J. (1983) A pLasmid vector for the introduction of DNA into plant cells without alteration of their normal genome

(113) Zabotra, P., Jocs, H., Garettello, C., Leenaers, J., Van Montagu, M. and Schell, J. (1983) A pLasmid vector for the introduction of DNA into plant cells without alteration of their normal genome

(114) Zabotra, P., Jocs, H., Garettello, C., Leenaers, J., Van Montagu, M. and Schell, J. (1983) A pLasmid vector for the introduction of DNA into plant cells without alteration of their normal genome

(115) Zabotra, P., Jocs, H., Garettello, C., Leenaers, J., Van Montagu, M. and Schell, J. (1983) A pLasmid vector for the introduction of DNA into plant cells without alteration of their normal genome

(116) Zabotra, P., Jocs, H., Garettello, C., Leenaers, J., Van Montagu, M. and Schell, J. (1983) A pLasmid vector for the introduction of DNA into plant cells without alteration of their normal genome

(14) Zhong, H., Rojard, N.G., Srinivasan, C., Sri

ckken, M.B. (1993) Transgenic plants of turfgrass
Aerostis palustris (L.) from microprojectile bo-mbardment of embryogenic callus. *Plant Cell Report*
5: 13-16.

【図3】本発明の説明

【図1】本発明の方法によましく用いることができるス
ーパーバイナリーベクターの所であるかの2つの構成
部を示す図である。【図2】本発明の方法によましく用いることができるバ
イナリーベクターの所であるかの2つの構成部を示す
図である。【図3】アグロバクテリウム属細胞の主要な2種類のベ
クターシステムである中間ベクターシステムとハイナリ
ベクターシステムの構成部位を示す模式図である。

【図4】アグロバクテリウム ツメファシエンスの細胞

原核細胞R28Kに由来する2種類のハイナリベクターシ
ステムを示す模式図である。

【発明の説明】

R1 アグロバクテリウム属細胞のT-DNAの左ボーダ
ー配列R2 アグロバクテリウム属細胞のT-DNAの右ボーダ
ー配列

TC テトラサイクリン抵抗性遺伝子

* SP スペクチノマイシン抵抗性遺伝子

TG イントロンGUS遺伝子

HPA ハイグロマイシン抵抗性遺伝子

NPT カナマイシン抵抗性遺伝子

K 制限酵素 Kpn I 部位

H 制限酵素 H ind III 部位

Amp' アンペニシリン抵抗性遺伝子

BAR barbicide

COS, cos ラムダファーリングのCOS部位

10 ori ori G418の複製開始点

P35S CaMV 35Sプロモーター

Trans ノハリシン合成酵素遺伝子のターミネーター

virB *Agrobacterium tumefaciens* A28Kに含まれるvirB
ラスミド pTiB5420のvirB1レジン領域中のvirB遺伝子virC *Agrobacterium tumefaciens* A28Kに含まれるvirC
ラスミド pTiB5420のvirB1レジン領域中のvirC遺伝子virD *Agrobacterium tumefaciens* A28Kに含まれるvirD
ラスミド pTiB5420のvirB1レジン領域中のvirD遺伝子

Vir アグロバクテリウム属細胞のT-DNAミドの全vir

20 領域

S Vir 強制原性アグロバクテリウム属細胞のT-DNA

ミド pTiB5420の全vir領域

S vir⁺ T-DNAミド pTiB542のvir領域の一部を含む

断片

(13) SPekch, N.G., Srinivasan, C., Sri

ckken, M.B. (1993) Transgenic plants of turfgrass
Aerostis palustris (L.) from microprojectile bo-mbardment of embryogenic callus. *Plant Cell Report*
5: 13-16.

【図3】本発明の説明

【図1】本発明の方法によましく用いることができるス
ーパーバイナリーベクターの所であるかの2つの構成
部を示す図である。【図2】本発明の方法によましく用いることができるバ
イナリーベクターの所であるかの2つの構成部を示す
図である。【図3】アグロバクテリウム属細胞の主要な2種類のベ
クターシステムである中間ベクターシステムとハイナリ
ベクターシステムの構成部位を示す模式図である。

【図4】アグロバクテリウム ツメファシエンスの細胞

原核細胞R28Kに由来する2種類のハイナリベクターシ
ステムを示す模式図である。

【発明の説明】

R1 アグロバクテリウム属細胞のT-DNAの左ボーダ
ー配列R2 アグロバクテリウム属細胞のT-DNAの右ボーダ
ー配列

TC テトラサイクリン抵抗性遺伝子

* SP スペクチノマイシン抵抗性遺伝子

TG イントロンGUS遺伝子

HPA ハイグロマイシン抵抗性遺伝子

NPT カナマイシン抵抗性遺伝子

K 制限酵素 Kpn I 部位

H 制限酵素 H ind III 部位

Amp' アンペニシリン抵抗性遺伝子

BAR barbicide

COS, cos ラムダファーリングのCOS部位

10 ori ori G418の複製開始点

P35S CaMV 35Sプロモーター

Trans ノハリシン合成酵素遺伝子のターミネーター

virB *Agrobacterium tumefaciens* A28Kに含まれるvirB
ラスミド pTiB5420のvirB1レジン領域中のvirB遺伝子virC *Agrobacterium tumefaciens* A28Kに含まれるvirC
ラスミド pTiB5420のvirB1レジン領域中のvirC遺伝子virD *Agrobacterium tumefaciens* A28Kに含まれるvirD
ラスミド pTiB5420のvirB1レジン領域中のvirD遺伝子

Vir アグロバクテリウム属細胞のT-DNAミドの全vir

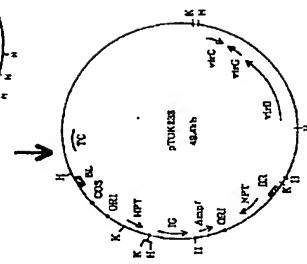
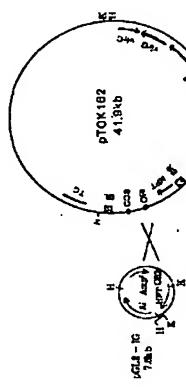
20 領域

S Vir 強制原性アグロバクテリウム属細胞のT-DNA

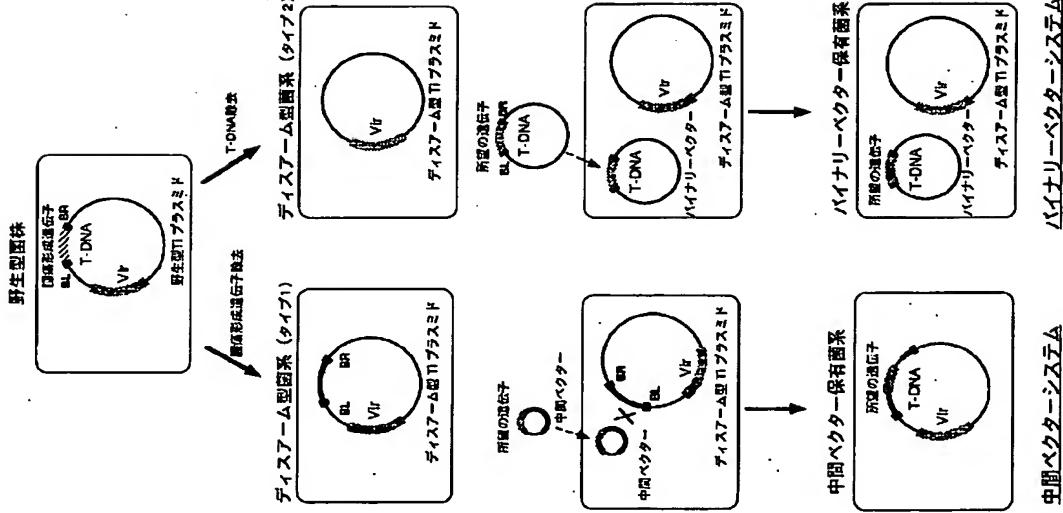
ミド pTiB542の全vir領域

S vir⁺ T-DNAミド pTiB542のvir領域の一部を含む

断片



[381]



四

